

学位論文（博士）

Establishment of an in vitro implantation model using a
newly developed mouse endometrial organoid

(新規子宮内膜オルガノイドを用いた in vitro 着床モデルの樹立)

氏名 藤村 大志

所属 山口大学大学院医学系研究科

医学専攻 産科婦人科学講座

令和 7 年 6 月

目次

【要旨】	2
【研究の背景と目的】	3
【方法】	4
【結果】	10
【考察】	21
【結語】	24
【謝辞】	24
【付録】	24
【参考文献】	31

【要旨】

着床とは、子宮内腔に到達した胚盤胞が子宮内膜に接着、浸潤する過程であり、妊娠の成立に不可欠な現象である。マウスの着床過程は、胚盤胞の接着、子宮内膜の陥凹、胚盤胞による上皮細胞の貪食、胚盤胞の浸潤の4つの段階に分類されるが、その詳細なメカニズムは十分に解明されていない。その要因の一つとして、着床過程を体外で再現するモデルが確立されていないことが挙げられる。近年、三次元培養技術を用いた子宮内膜オルガノイドが樹立、報告され、子宮内膜の構造や機能を模倣するモデルとして注目されている。しかし、子宮内膜上皮細胞の頂端側がオルガノイドの内側を向いており、かつ子宮内膜間質細胞を含まない構造であるため、このオルガノイドを用いても *in vitro* で着床現象を再現することは不可能であった。そこで、本研究では子宮内膜上皮細胞の頂端側がオルガノイドの外側を向き、かつ子宮内膜間質細胞が上皮の内側に存在する新たなマウス子宮内膜オルガノイドを作成し、マウス胚盤胞と共培養することで体外で着床現象を再現するモデルを樹立することを目的とした。

マウスから子宮内膜上皮細胞と子宮内膜間質細胞を分取、混合し、単層培養に続き浮遊培養を行ったところ、培養10日間でオルガノイドの形成を認めた。このオルガノイドは E-cadherin 陽性の上皮細胞が外側を覆っており、Vimentin 陽性の間質細胞が上皮の内側に充満していた。

さらに、上皮の頂端側を示す MUC1 はオルガノイドの外側を向いていた。次に、このオルガノイドとマウス胚盤胞を共培養し、着床の4段階を確認した。また、着床期に必要な女性ホルモン添加群と非添加群に分けて共培養を行ったところ、ホルモン添加群において有意に高い着床率を認めた。そして、着床後の胚盤胞由来細胞は Proliferin 陽性であり、周囲の間質細胞は Cox-2 陽性であることから、それぞれ栄養膜細胞、脱落膜化細胞へと分化したことを確認した。

以上より、本モデルが体外で着床過程を再現することのできるモデルであることを示した。

【研究の背景と目的】

着床とは、子宮内腔に到達した胚盤胞が子宮内膜に接着・浸潤し、絨毛構造を形成するまでの一連の現象である[1]。子宮内膜上皮細胞（Endometrial Epithelial Cells: EECs）と子宮内膜間質細胞（Endometrial Stromal Cells: ESCs）は着床の場を提供し、卵巣から分泌されるステロイドホルモンなどと複雑な細胞間伝達を経て着床は成立する。この着床現象のいずれかが阻害されると妊娠は成立しない。この病態は、着床不全と呼ばれ、有効な治療法は確立されていない[2]。ヒトの着床期の研究を *in vivo* で直接的に行うことは倫理的問題から困難であり、着床現象の詳細なメカニズムは未だ明らかにされていない。そのため、*in vitro* で着床現象を再現・観察可能なモデルの確立が求められていた。

マウスにおける着床過程は、(1) Attachment：子宮内膜上皮細胞への胚盤胞の接着、(2) Invagination：子宮内膜上皮細胞の陥凹、(3) Entosis：栄養膜細胞による子宮内膜上皮細胞の貪食、(4) Invasion：子宮内膜間質細胞層への胚盤胞の浸潤、の4つの段階がある（付録1 A）。これまでの *in vitro* での着床研究の多くは、EECs あるいは ESCs を用いた二次元培養で行われてきた[3-5]。それらは培養皿上で単層培養した EECs や ESCs の上に、胚盤胞や栄養膜細胞の凝集塊を落とす実験であり、着床過程における Attachment の部分までしか再現することはできなかった。その後 EECs と ESCs を層状に培養する方法なども報告されたが[6]、着床過程を十分に再現できるモデルは確立していない[7]。近年、三次元培養技術を用いた子宮内膜オルガノイドが報告された[8, 9]。オルガノイドは平面培養と比較し、より生体に近い臓器構造、臓器機能を模倣するとされている[10]。しかし、着床研究を行う上で、従来型の子宮内膜オルガノイドにはいくつかの問題がある。第一に、子宮内膜オルガノイドの EECs は基底層（Basolateral side）がオルガノイドの外側、頂端側（apical-side）がオルガノイドの内側を向く極性（Basal-out/apical-in polarity）を有していることで

ある。胚盤胞は EECs の apical-side から接着・浸潤するため、従来型オルガノイドでは一連の着床現象を再現することは不可能である（付録 1B）。第二に、オルガノイドはマトリゲルといった細胞外マトリックス（ECM: Extracellular matrix）の中で培養されることである[9, 11]。マトリゲルの中に包埋された状態では、胚盤胞とオルガノイドが直接接することができない。第三に、EECs 内側に ESCs が存在しないことである。ESCs は着床時に脱落膜化と呼ばれる劇的な形態的・機能的分化を起こし[12, 13]、胚盤胞は脱落膜化 ESCs の層に浸潤するため、ESCs は着床過程を再現するためには不可欠である。以上より、in vitro で着床過程を再現するためには、ECM に包埋されず、EECs と ESCs を含み、EECs の apical-side がオルガノイドの外側を向いている新規の子宮内膜オルガノイドを作製することが不可欠である（付録 1B）。本研究では、これらの特徴をもつ新規のマウス子宮内膜オルガノイドを作製し、マウス胚盤胞と共培養を行うことにより in vitro で着床過程を再現することを目的とした。

【方法】

1. 実験動物

C57/BL6N マウスおよび C57BL/6-Tg (CAG-EGFP) マウスは、日本 SLC より購入した。本研究は、施設内動物実験倫理委員会の承認のもと行われた。全てのマウスは一定の温度、湿度、明暗サイクル下で飼育し、水と餌は自由に摂取させた。

2. マウスからの子宮内膜オルガノイド作製

子宮内膜オルガノイドの作製は、既報[8]を参考にし、若干の修正を加えた。8 週齢の C57/BL6N マウス 2 匹にエストラジオール：プロギノンデポー筋注（0.01 mg/g；富士製薬:Cat#872473）を皮下投与し、エストラスサイクルとした[14]。3 日後に安楽死させ、子

宮を摘出・切開し、PBS で十分に洗浄し、2 mm の断片に細切した。細切した組織を 1 mg/ml コラゲナーゼ (Sigma-Aldrich:Cat#C5138) および 0.1 mg/ml DNase I (Sigma-Aldrich:Cat#10104159001) を含む PBS (FUJIFILM:Cat#166-23555) 中で、37°C ウォーターバスにて穏やかに振盪 (100 bpm) しながら 30 分間インキュベートした。その後、PBS を最終容量 15 mL まで加えた後、以前に報告された方法[8, 15]に従って上皮細胞の分離を行った。組織片を 10 回ピペッティングすることにより上皮片を機械的に解離させ、1 分間静置した。上清には上皮細胞画分が含まれるため[15]、これを回収した。この操作を 2 回繰り返した。上清を 4°C、200 g で 3 分間遠心分離した後、ペレットを基礎培地{advanced DMEM (Thermo Fisher Scientific:Cat#12634010) に Glutamax (0.2 mM; Thermo Fisher Scientific:Cat#35050061)、HEPES (1 mM; Thermo Fisher Scientific:Cat#15630080)} を加えて再懸濁し、2 回遠心分離操作を繰り返した。最後に、ペレットを増殖培地 (Boretto et al., 2017) {advanced DMEM に penicillin/streptomycin (1%; FUJIFILM:Cat#161-23181)、Gultamax (2 mM)、B27 (2%; Thermo Fisher Scientific:Cat#17504044)、N2 (1%; Thermo Fisher Scientific:Cat#17502048)、insulin-transferrin-selenium (ITS, 1%; Thermo Fisher Scientific:Cat#41400-045)、HEPES (10 mM)、nicotinamido (1 mM; Thermo Fisher Scientific:Cat#N0636)、EGF (50 ng ml⁻¹; Thermo Fisher Scientific:Cat#PMG8043)、FGF-Basic (50 ng ml⁻¹; FUJIFILM:Cat#06205181)、Noggin (100 ng ml⁻¹; Thermo Fisher Scientific:Cat#120-10C)、TGF β /Alk inhibitor A83-01 (0.5 μ M; Thermo Fisher Scientific:Cat#2939/10)、R-spondin (200 ng ml⁻¹; Thermo Fisher Scientific:Cat#51996611)、WNT3A (200 ng ml⁻¹; Thermo Fisher Scientific:Cat#315-20)} に Y27632 (10 μ M; MedChemExpress:Cat#HY-10583) を 3 mL 加えて EECs 分画とし、その後の ESCs 分画との処理まで氷上に保存した。先の操作にて EECs 分画を除去した残りのペレットを、1

mg/sml コラゲナーゼおよび 0.1 mg/ml DNase I でさらに 50 分間消化し、70 μ m セルストレーナー (Falcon:Cat#352350) を通して濾過した後、4°C、500 g で 5 分間遠心分離した。ESCs 分画となったペレットを基礎培地に再懸濁し、同様に 2 回ほど遠心分離を行い洗浄した。予め調製した EECs 分画を ESCs 分画に加え、穏やかに混合した。混合した懸濁液を、12 ウェル培養皿 (Falcon:Cat#353043) に 1 ml ずつ播種した。細胞を 37 °C、5% CO₂ インキュベーター内で培養し、増殖培地を培養 1 日目、3 日目、5 日目に交換した。培養 1 日目に、非接着細胞を除去するために、培養皿を基礎培地で 2 回洗浄し、増殖培地と交換した。培養 2 日目に、上皮細胞および間質細胞は、培養皿の端から中心に向かって自然に凝集し始めた。この過程を、共焦点定量イメージサイトメーター (CQ-1;Yokogawa) を用いて経時的に観察した。培養 3 日目に凝集塊がリング状になった時点で、1000 μ L チップを用いて 1.5 mL チューブに回収し、先端をわずかにトリミングした 200 μ L ピペットを用いてピペッティングを行い、小さい凝集塊へとゆるやかに解離させた。凝集塊は同じ培養皿に再播種した。培養 7 日目に、全ての凝集塊を回収し、96 ウェル細胞低接着性 U 字皿 (住友ベークライト:Cat#MS-9096U) に個別に播種し、増殖培地中で培養した。増殖培地は隔日で交換した。3 日間の浮遊培養後 (10 日目)、作製されたオルガノイドをその後の実験に用いた。

3. 蛍光免疫染色

接着培養下の組織およびオルガノイドの免疫蛍光染色は、製造元のプロトコルを参考にし、CUBIC 試薬を用いた組織透明化後に行った[16, 17]。各組織から培地を除去し、4%パラホルムアルデヒドを加えて 4°C で 24 時間固定した。組織を CUBIC-L (東京化成工業:Cat#T3740) で 37°C、2 日間前処理し、その後 PBS で十分に洗浄した。続いて、CUBIC-

HVTM1 3D 核染色キット（東京化成工業:Cat#C3709）を用いて DAPI 染色した。続いて一次抗体（付録 2）を加え室温で穏やかに振盪しながら 2 日間インキュベートした。その後、PBS で各 2 時間、3 回洗浄し、二次抗体（付録 2）を加え室温で穏やかに振盪しながら 1 日間インキュベートした。1%ホルムアルデヒドで後固定を行い、PBS で洗浄した。組織を 50% CUBIC-R+（東京化成工業:Cat#T3983）で一晩インキュベートし、続いて 100% CUBIC-R+で穏やかに振盪しながら 1 日間インキュベートした。画像は CQ1 または共焦点顕微鏡（STELLARIS 8; Leica）を用いて取得した。3D 画像は STELLARIS 8 または Imaris（OXFORD INSTRUMENTS）を用いて再構築した。その他の免疫染色は凍結組織切片を作製したのちに行った。新鮮な組織を 4%パラホルムアルデヒドで 16 時間固定し、PBS で洗浄した。その後、組織を 15%スクロース / PBS 中で 16 時間、続いて 30%スクロース / PBS 中で 24 時間処理した。組織を Optimal Cutting Temperature (OCT) コンパウンド（SAKURA:Cat#45833）に包埋した。クリオスタット（Leica）を用いて凍結組織切片（厚さ 5 μ m）を作製し、スライドガラスに貼付した。スライド上の組織を PBS を用いて 3 回洗浄した。切片を室温で 15 分間、0.3% Triton X-100（FUJIFILM:Cat#A16046）/ PBS で透過処理し、続いて室温で 1 時間程 5%ヤギ血清でブロッッキングし、非特異的反応を抑えた。切片に一次抗体(付録 2)を加え 4°Cで一晩インキュベートした。PBS で洗浄後、適切な蛍光色素結合二次抗体（付録 2）と室温で 2 時間インキュベートした。核を DAPI を用いて 15 分間染色した。画像は BZ-X800 または STELLARIS 8 を用いて取得した。

4. TUNEL 染色

アポトーシスの評価は、In Situ Apoptosis Detection Kit（Takara:Cat#MK500）のプロトコルを参考にし、TUNEL 染色を用いて調べた[18]。三次元培養開始から 9 日後のオル

ガノイドを解析に用いた。キットに含まれるラット乳腺のスライスを、アポトーシス細胞の陽性対照として用いた。

5. コラーゲン線維染色

三次元培養開始から 3 日後のオルガノイドを解析に用いた。コラーゲン線維は、Picosirius Red Stain Kit (Polysciences:Cat#24901) のプロトコールに則り染色した[19]。

6. 子宮内膜上皮細胞の高さの解析

培養 7 日目（浮遊培養直前）および培養 10 日目（浮遊培養後）のオルガノイドから凍結切片を作製し、免疫蛍光染色を行った。E-cadherin 陽性細胞の基底膜から頂端側の細胞膜までの径を任意の切片で測定し、細胞の高さと定義した。各群 15 サンプルを測定し、データをドットプロットとして示した。統計的有意性は t 検定を用いて決定し、p 値<0.01 を有意差ありとした。

7. 走査型電子顕微鏡

オルガノイドを 2%グルタルアルデヒドおよび 2%ホルムアルデヒドを含む緩衝液（100 mM NaCl, 30 mM HEPES, および 2 mM CaCl₂, pH 7.4）中で 2 時間固定し、四酸化オスミウム（1% in sodium cacodylate buffer (100 mM sodium cacodylate and 2 mM CaCl₂, pH 7.0)）で 4°C、2 時間後固定した。オスミウム処理したサンプルを、段階的に濃度を上げたエタノールで脱水し、t-ブタノール（和光, 028-03386; Sigma, 471712）に置換した。全てのサンプルを真空チャンバー内で 0-5°Cで凍結乾燥した（VFD-21S; Vacuum Device）。乾燥したサンプルをオスミウムプラズマコーター（Neoc-ST; Meiwa Fosis）を用いて 5 nm の

オスミウムでコーティングした。走査型電子顕微鏡画像は、電界放出型走査型電子顕微鏡 (Quanta3D FEG, Thermo Fisher Scientific) を用いて取得した。ステロイドホルモン添加がピノポードの発現に影響を与えるかどうかを調べるため、オルガノイドをステロイドホルモン {エストラジオール: Estradiol: E2 (10^{-8} M)、3',5'-cyclic adenosine monophosphate: cAMP (0.5mM)、メドロキシプロゲステロン: medroxyprogesterone acetate: MPA (10^{-6} M)} 添加群または非添加群に分け、48 時間処理した。その後、各群 3 つのオルガノイドの表面画像を走査型電子顕微鏡を用いて取得し、ピノポードの数をカウントした。

8. ヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色

オルガノイドの形態構造を調べるため、既報[20]を参考にし、凍結切片に対して H&E 染色を行った。

9. マウスにおける体外受精

マウスの体外受精 (IVF) は、既報[21]を参考にし行った。3-4 週齢の雌 C57BL/6-Tg (CAG-EGFP) マウスに対して、卵胞刺激として 7.5 IU の妊娠ウマ血清ゴナドトロピン (PMSG) (Aska Animal Health) を腹腔内投与した。48 時間後、排卵を誘発するために 7.5 IU のヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) (Aska Animal Health) を投与した。hCG 注射後 13 時間で雌マウスを安楽死させ、卵管を摘出した。卵子卵丘複合体 (COCs) をヒト卵管液 (HTF) (Kyudo) 培地ドロップに分離した。9-10 週齢の雄 C57BL/6-Tg (CAG-EGFP) マウスから精巣上体を採取し、精子を HTF ドロップに加えた。精子濃度を $2 \times 10^2 / \mu\text{L}$ に調整し、COCs を含む HTF 滴に精子を添加し受精させた。受精 2 時間後に、受精卵を新鮮な Potassium Simplex Optimized Medium (KSOM) (Kyudo) で 10 回洗浄した。受精後 6

時間、2つの前核が観察できる受精卵のみを KSOM 滴を含む培養皿に移し、5日目まで培養した。5日目の朝、酸性タイロド溶液（Sigma-Aldrich:Cat#T1788）を用いて拡張胚盤胞を孵化させた[22]。蛍光顕微鏡を用いて GFP 発現陽性の孵化胚盤胞を同定した。

10. 新規オルガノイドとマウス胚盤胞を用いた in vitro 着床モデルの樹立

着床期子宮内膜を模倣するためにステロイドホルモン類 {E2 (10^{-8} M)、cAMP (0.5 mM)、MPA (10^{-6} M)} を添加した群をホルモン添加群、添加しない群をホルモン非添加群とし、48時間培養した。96 well 細胞低接着性 U 字皿の中でオルガノイド 1 つに対して GFP 陽性胚盤胞を 1 つずつ加え、共培養を行った。in vitro での着床過程を観察するために、倒立蛍光顕微鏡 (BZ-X800) を用いて毎日画像を取得した。in vitro での着床過程を共焦点顕微鏡を用いたタイムラプスイメージングで詳細に可視化するために、オルガノイドを Track It Red kit (Cell Explorer Live Cell Tracking Kit Red Fluorescence; AAT Bioquest:Cat#22623) のプロトコルを参考にして 20 分間培養した。その後、基礎培地で 5 回洗浄し、赤色に標識されたオルガノイド一つに対して、GFP 陽性胚盤胞を一つ共培養させ、増殖培地を隔日で穏やかに交換した。CQ-1 を用いて、共培養開始後 48 時間から 48 時間タイムラプスイメージングを行った。画像は、培養皿の底から高さ 150 μ m まで、4 μ m 間隔で 20 分ごとに取得した。取得した TIFF データを Imaris ソフトウェアを用いて 3D 画像に再構築した。

【結果】

1. 新規マウス子宮内膜オルガノイドの作製

マウス子宮内膜上皮細胞 (EECs) と子宮内膜間質細胞 (ESCs) を回収し、既報のオルガ

ノイド培養に特化した培地[8]を用いて、接着培養を行った(図 1A)。培養 2 日目から、EECs と ESCs の自然凝集が観察された(図 1 B, day 2, 黄矢頭)。経時的に観察すると、細胞群は培養皿の辺縁から中央にむけて徐々に凝集し、培養細胞のほとんどすべてを含むリング状凝集塊を形成することが明らかとなった(図 1 B, C, day 3)。この凝集塊の細胞構成を調べるために免疫染色を行ったところ、EECs と ESCs が無秩序に存在していた(図 1 C, day 3)。適切な大きさの凝集塊を作製するために、リング状凝集塊をピペッティングにより小さな凝集塊に分散させ、再度同じ培養皿に播種して培養を継続した。培養 5 日目にはそれぞれの凝集塊の中で自己凝集が生じ、EECs は凝集塊の外側へ、ESCs は凝集塊の内側へ向かっていた(図 1 C, day 5)。培養 7 日目には、凝集塊は三次元的な Ω 型構造を呈し、底面のみが培養皿と接着している状態であった。EECs の大部分が凝集塊の外側を覆っており、その内側に ESCs が充満していた(図 1 C, day 7)。走査型電子顕微鏡(SEM)を用いた凝集塊の観察においても、培養 5 日目には凝集塊の外側を EECs が覆う面積が増え始め(図 1 D, day 5, 緑矢頭)、培養 7 日目には凝集塊の外側のほとんどすべてを EECs が覆うようになることが確認できた(図 1 D, day 7, 緑矢頭)。一般的に細胞培養に頻用されている培養培地(DMEM に 10% FBS 添加)をオルガノイド培地の代わりに用いて接着培養を行ったところ、凝集塊は形成されなかったことから(付録 3)、オルガノイド培地が凝集塊の形成に不可欠であることが示された。さらに、ESCs を含まない EECs 単独での接着培養でも凝集塊が形成されなかったことから(付録 4)、凝集塊の形成において、ESCs は必須な細胞であ

ることが示された。

図 1

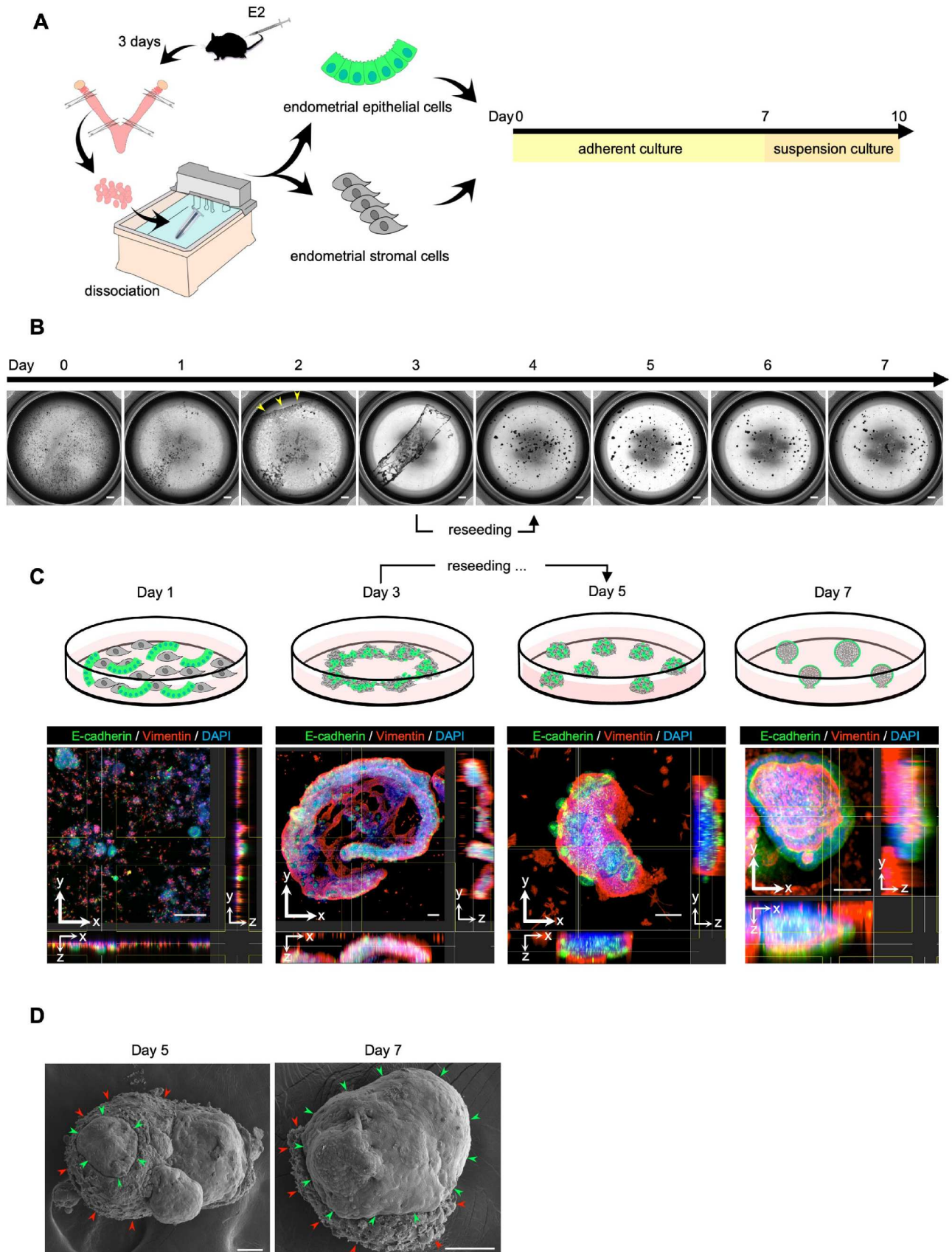


図1 接着培養における EECs と ESCs の自然凝集塊の出現

- (A) マウス子宮内膜オルガノイド作製プロトコール
- (B) 培養2日目から EECs と ESCs の自然凝集が観察され（黄色の矢頭）、培養3日目には大きなリング状構造を形成した。これらを小さな凝集塊に分散させ、再播種した。スケールバー：1000 μm 。
- (C) 接着培養における自然凝集塊出現の模式図および三次元免疫染色像。上段：模式図において EECs は緑色、ESCs は灰色で示す。下段：凝集塊の代表的な x-y、x-z、y-z 断面図。画像は共焦点顕微鏡で撮影した。EECs は E-cadherin、ESCs は Vimentin、核は DAPI で染色した。培養5日目には、凝集塊の中で EECs は外側へ、ESCs は内側へと組織構成が変化していた。培養7日目には、これらの凝集塊は3次元的な Ω 字型構造を形成し、その底面のみが培養皿に接着していた。スケールバー：100 μm 。
- (D) 接着培養における自然凝集塊の代表的な走査型電子顕微鏡（SEM）像。5日目において、EECs は滑らかな表面（緑色の矢頭）として凝集塊の外側に部分的に局在していた。7日目には、凝集塊はほとんど EECs で覆われていたが（緑色の矢頭）、培養皿への接着部位では ESCs が露出したままであった（赤色の矢頭）。スケールバー：50 μm 。

培養7日目に凝集塊を回収し、96 well 細胞低接着性 U 字皿に移し、浮遊培養を開始した（図2）。浮遊培養開始3日後、明視野での観察において凝集塊の外側を覆う透明な層が徐々に厚くなり、最終的に凝集塊全体を包み込んだ（図2 A, day 10）。この透明な層は、E-cadherin 陽性であり、EECs で構成される上皮細胞層であった（図2 B）。この過程で、扁平な EECs は細胞高を増し、円柱状細胞へと変化した（図2 B）。SEM を用いて観察したところ、凝集塊の全ての表面が滑らかな EECs に覆われており、露出した ESCs は観察されなかった（図2 C）。これらの結果は、浮遊培養により EECs が成熟すること、また浮遊培養が EECs に完全に覆われたオルガノイドを作製するために不可欠であることを示している。

凝集塊の組織切片観察では、E-cadherin 陽性 EECs が外側一層で陽性となり、Vimentin 陽性の ESCs が内部に充満していた（図2 D, E）。組織を構成するほとんど全ての細胞がプロゲステロン受容体陽性であった（図2 F）。他の上皮マーカー（EpCAM および CK8）と間質マーカー（PDGFR α ）も、それぞれの細胞で発現していた（付録5 A）。上皮細胞の 48.6 $\pm$ 5.6%で腺上皮細胞のマーカーである FOXA2 が陽性であった[23]（付録5 B）。これは、

EECs にうち、残りおよそ半数の FOXA2 陰性細胞が管腔上皮細胞で構成されていること

図 2

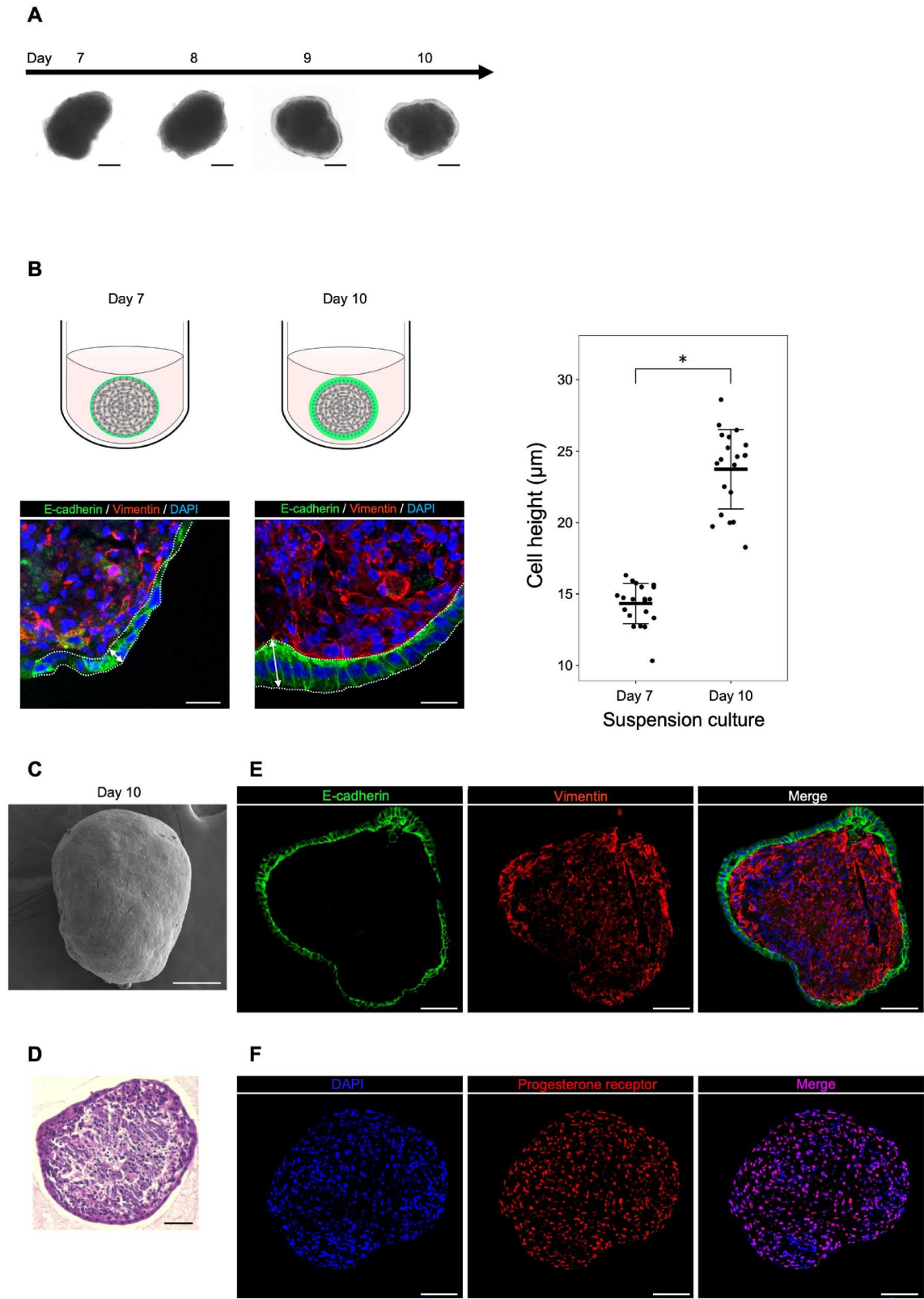


図2 浮遊培養は EECs と ESCs を含む子宮内膜オルガノイドの形成を促進する

- (A) 凝集塊の浮遊培養における明視野像。回収した凝集塊を細胞低接着性 U 字皿で浮遊培養を行った。3 日間の浮遊培養中に、外表面を覆う透明な層が徐々に厚くなり、最終的に凝集塊全体を包み込んだ。スケールバー：100 μm 。
- (B) 浮遊培養下における凝集塊の模式図と免疫染色像。(左) 凝集塊の凍結切片に対する免疫染色の代表像を示す。EECs は E-cadherin、ESCs は Vimentin、核は DAPI で染色した。スケールバー：20 μm 。矢印は測定された高さを指す。(右) 浮遊培養前 (7 日目) と後 (10 日目) の EECs の細胞の高さの定量値を示す。データは各群 15 個の凝集塊の平均値 $\pm$ 標準偏差を示す。各データ点はドットで示されている。*, $P < 0.01$ (t-検定)。
- (C) 浮遊培養後の凝集塊の SEM 像。凝集塊の全ての表面は滑らかな EECs で覆われており、露出した ESCs は観察されなかった。スケールバー：100 μm 。
- (D) 浮遊培養後の凝集塊の凍結切片に対する HE 染色像。スケールバー：50 μm 。
- (E) 浮遊培養後の凝集塊の凍結切片に対する免疫染色像。EECs は E-cadherin、ESCs は Vimentin、核は DAPI で染色した。スケールバー：50 μm 。
- (F) 浮遊培養後の凝集塊の凍結切片に対するプロゲステロン受容体の免疫染色像。核は DAPI で染色した。スケールバー：50 μm 。

を示唆している。さらに、オルガノイドの内部には豊富なコラーゲンが存在しており (付録 6)、これは vivo におけるマウス子宮内膜の間質層におけるコラーゲンの分布と一致している [24]。

以上より、本研究で開発された新規子宮内膜オルガノイドは、ECM に包埋される必要がなく、ESCs が内側に、EECs が外側に位置する特徴を有する。

2. 新規子宮内膜オルガノイドの上皮細胞の極性

胚盤胞との共培養により in vitro で着床過程を再現するためには、子宮内膜オルガノイドの EECs における頂端側が外側を向く極性 (apical-out polarity) を持つ必要がある (付録 1 B)。in vivo において EECs の頂端側に強く発現するタンパク質である Mutin-1 (MUC1) [25] (図 3 A, 左) は、新規子宮内膜オルガノイドにおける EECs の外側に強く発現していた (図 3 A, 右)。さらに、SEM を用いて新規子宮内膜オルガノイドの外側表面を観察したところ、頂端側に EECs の頂端側に発現する微絨毛 [26] が存在していた (図 3 B)。さらに、

EECs の表面には大きなドーム状の突起も観察された（図 3 B、白色矢頭）。この構造は、EECs のうち管腔上皮細胞表面に発現するピノポードに類似している[27]。以上より、新規子宮内膜オルガノイドが apical-out polarity の極性を有し、in vitro で胚盤胞と共培養した際に着床現象を再現できる可能性を示唆している。

図 3

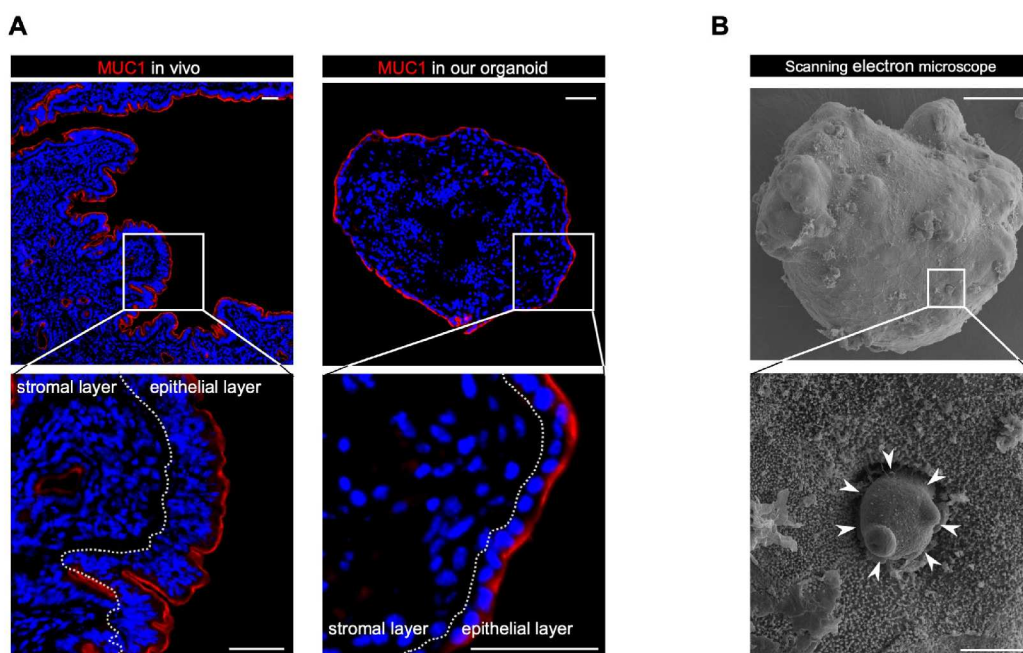


図 3 新規子宮内膜オルガノイドにおける上皮細胞は apical-out polarity を有す

A. マウス子宮内膜（左）および新規子宮内膜オルガノイド（右）における MUC1 の免疫染色像。点線は上皮層と間質層の境界を示す。核は DAPI で染色した。スケールバー：50 μm 。

B. 新規子宮内膜オルガノイド表面の走査型電子顕微鏡（SEM）像。オルガノイド表面に、上皮細胞における頂端側の特徴である微絨毛（apical 面の特徴）が広く存在している。また、EECs の表面には大きなドーム状の突起も観察され、これらの構造はピノポードに類似していた（白矢頭）。スケールバー：50 μm （上）、5 μm （下）。

3. 新規子宮内膜オルガノイドを用いた in vitro 着床モデルの樹立

in vitro 着床モデルの概要を図 4 A に示す。子宮内膜は E2、cAMP、MPA の刺激により、胚盤胞を受容できる着床期子宮内膜へと変化する。そこで、新規子宮内膜オルガノイドに対して E2、cAMP、MPA を添加したホルモン添加群と非添加群を作製し 48 時間培養した。

これらのホルモンに応答して着床期の子宮内膜へと変化しているか検証するため、着床期子宮内膜のマーカーを調べた。ホルモン添加群では、EECs において FOXO1 の発現が上昇し（付録 7）、プロゲステロン受容体（PR）の発現が消失した（付録 8）。これらは着床期子宮内膜において観察されるよく知られた変化であり[28]、新規子宮内膜オルガノイドがホルモン添加に応答して着床期子宮内膜を再現できることを示している。

胚盤胞は GFP トランスジェニックマウスから採取した。ホルモン処理したオルガノイドを細胞低接着性 U 字皿で胚盤胞と共培養した。共培養開始から約 48 時間後に胚盤胞がオルガノイドに接着した。96 時間後には、胚盤胞はオルガノイドの内部に侵入した（図 4 A）。この過程をリアルタイムで観察するため、生細胞追跡アッセイを用いて、共培養直前のオルガノイドを赤色蛍光色素で標識した。その後、共培養開始 48 時間後から 96 時間後まで、共焦点顕微鏡を用いたタイムラプスイメージングで *in vitro* 着床過程を観察した（付録 9）。まず、胚盤胞はオルガノイドの表面（EECs 層）に接着した（図 4 B1、attachment）。次に、EECs は ESCs 層に陥入し、胚盤胞を包み込む腔を形成した（図 4 B2、invagination）。その後 EECs は GFP 陽性胚盤胞により貪食[29, 30]された（図 4 B3、entosis）。最終的に GFP 陽性胚盤胞は EECs 層の下にある ESCs 層に浸潤した（図 4 B4、invasion）。一方でホルモン添加を行っていないオルガノイドには胚盤胞は接着しなかった（図 4 C）。そこで、ホルモン添加が着床に与える影響を検証するため、ホルモン添加群と非添加群のそれぞれ 26 サンプルについて *in vitro* 着床を評価した。着床が達成されたかどうかを正確に評価するため、胚盤胞との共培養終了後、オルガノイドを組織透明化試薬で透明化し、E-cadherin を用いた免疫染色を行い、EECs 層を可視化した。その後、共焦点顕微鏡を用いてオルガノイド全体の画像を取得し評価した。着床の判定は、EECs の下にある ESCs 層内への GFP 陽性胚盤胞由来細胞の浸潤と定義した。ホルモン添加群の着床率は 73.1% (19/26) であり、

非添加群の 15.3% (4/26) と比較して有意に高かった (付録 10)。

図 4

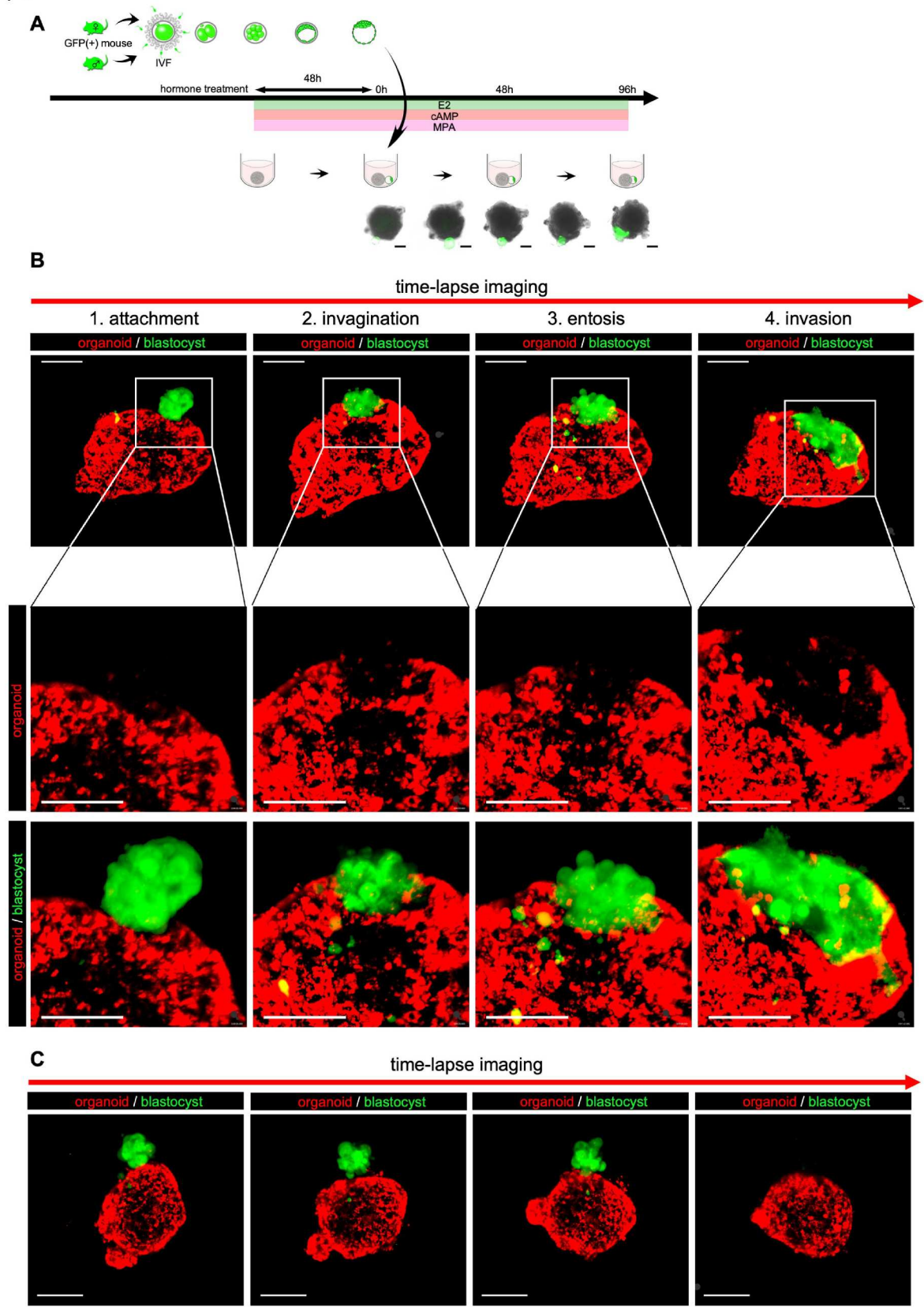


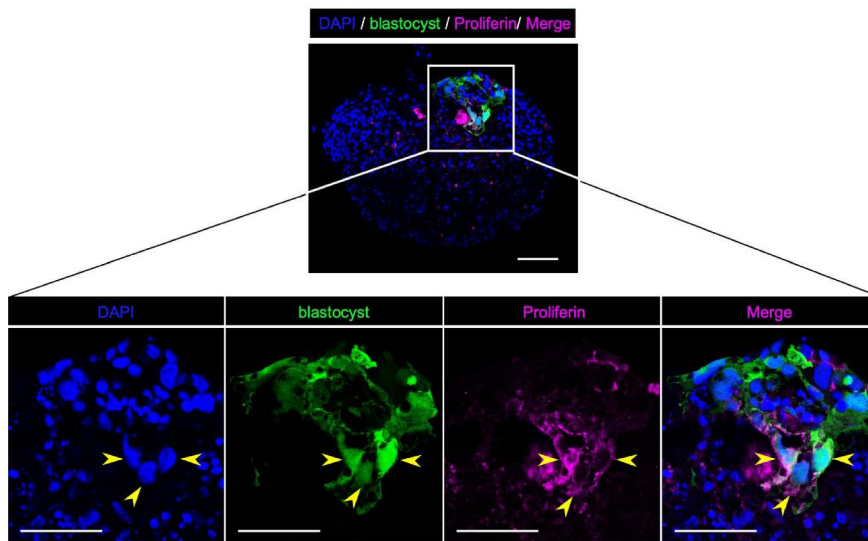
図 4 新規子宮内膜オルガノイドを用いた *in vitro* 着床モデルにおけるタイムラプスイメージング

- A. *in vitro* 着床モデルの模式図。着床期子宮内膜を誘導するため、E2、cAMP、MPA で 48 時間処理した。その後、GFP トランスジェニックマウスから得られた GFP 陽性の胚盤胞と細胞低接着性 U 字皿で共培養した。*in vitro* 着床過程を明視野像を示す。胚盤胞 (GFP) は共培養開始から約 48 時間後にオルガノイドに接着した。96 時間後には、胚盤胞はオルガノイドの内部に侵入した。スケールバー：100 μm 。
- B. *in vitro* 着床モデルにおけるタイムラプスイメージング。ホルモン添加後、オルガノイドを赤色蛍光色素で標識し、胚盤胞と共培養した。*in vitro* 着床過程は、共培養開始 48 時間後から 96 時間後まで共焦点顕微鏡を用いたタイムラプスイメージングで観察した。胚盤胞はオルガノイドの表面に接着し (attachment)、その後、EECs が陥入して胚盤胞を包み込む腔を形成し (invagination)、GFP 陽性の胚盤胞によって EECs が貪食された (entosis)。最終的に、胚盤胞は EECs 層の下にある ESCs 層に浸潤した (invasion)。スケールバー：100 μm 。
- C. ホルモン非添加群の胚盤胞とオルガノイドの共培養におけるタイムラプスイメージング。ホルモン非添加群のオルガノイドを胚盤胞と共培養した。共培養開始 48 時間後から 96 時間後まで共焦点顕微鏡を用いたタイムラプスイメージングで胚盤胞の挙動を観察した。胚盤胞はオルガノイドに接着しなかった。スケールバー：100 μm 。

我々はさらに、*in vitro* 着床後の細胞の分化について免疫染色を用いて検証した。ESCs 層に侵入した胚盤胞由来細胞は巨核化しており、栄養膜巨細胞のマーカーである Proliferin 陽性であった (図 5 A、矢頭)。これは、*in vitro* 着床中に胚盤胞を構成する細胞が絨毛細胞へと分化誘導されたことを示している。さらに、侵入した胚盤胞由来細胞を取り囲む ESCs は、脱落膜化マーカーである Cox-2 陽性であった。これは、*in vitro* 着床中に ESCs の脱落膜化が誘導されたことを示している (図 5 B)。これらの結果を総合すると、新規子宮内膜オルガノイドは、ホルモンに応答して子宮内膜の受容性を変化させ、着床初期過程を再現する性質を持つことが示された。

図 5

A



B

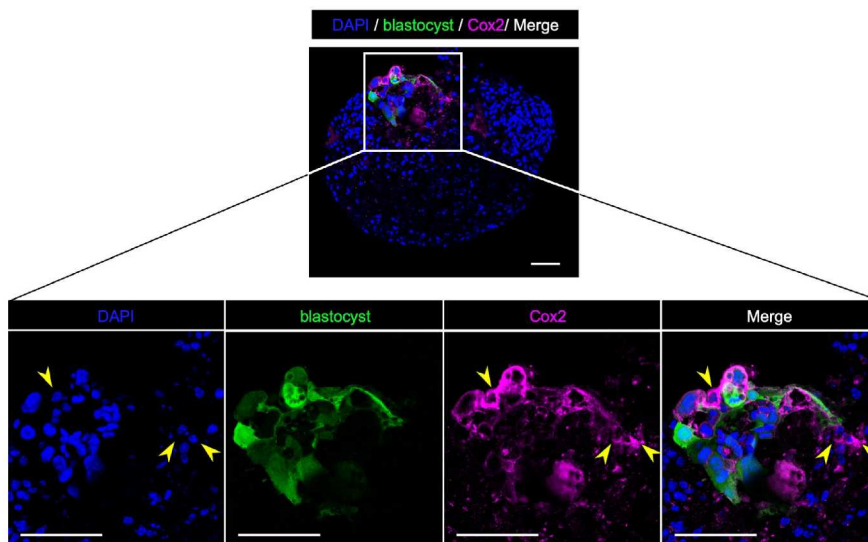


図 5 *in vitro* 着床モデルにおいて着床後反応が観察された

A. 着床陽性オルガノイドの凍結切片における Proliferin の免疫染色像。核は DAPI で染色した。矢頭は、核が大きく Proliferin 陽性である胚盤胞由来の栄養膜巨細胞を示す。スケールバー：50 μm 。

B. 着床陽性オルガノイドの凍結切片における Cox-2 の免疫染色像。核は DAPI で染色した。矢頭は、侵入した胚盤胞由来細胞を取り囲み、Cox-2 陽性である脱落膜化 ESCs を示す。スケールバー：50 μm 。

【考察】

着床は子宮内で生じる現象であり、その詳細なメカニズムは未だ十分に明らかにされていない。in vitro で着床を再現するためには、in vivo 環境に酷似した子宮内膜様構造を構築することが不可欠である。近年のオルガノイド培養技術の進展により、マトリゲル中で培養された子宮内膜上皮オルガノイドが開発された[8, 9]。しかし、これらのオルガノイドは上皮の頂端側が内側を向く極性（apical-in polarity）を持つため、in vitro で着床現象を再現することは困難であった。本研究で作製した新規子宮内膜オルガノイドは、MUC1 の発現、微絨毛、ピノポードの存在によって示されるように、EECs の頂端側が外側を向く極性を示した。これにより in vitro で胚盤胞の EECs への接着を再現することが可能になった。

従来の子宮内膜オルガノイドのもう一つの問題点は、ESC の欠如であった[10]。着床において、EECs を突破した胚盤胞由来の栄養膜細胞は、脱落膜化した ESC 層に浸潤する[31]。脱落膜化 ESC は、妊娠の成立に不可欠な多数の細胞機能を獲得する[12, 13, 32-35]。さらに、胚盤胞の EECs への接着は、ESC から EECs へのシグナル伝達によって複雑に制御されている[36]。これらは、着床の成立には ESC が不可欠であることを示している。我々が作製した子宮内膜オルガノイドは、EECs の内部に ESC が密に充満されている点で新規性がある。

従来の子宮内膜オルガノイドと異なり、我々の子宮内膜オルガノイドのもう一つの利点は、細胞外マトリックス (ECM) に包埋する必要がないことである。ECM に包埋すると、上皮細胞が露出しない。よって、ECM の存在は共培養条件下における EECs と胚盤胞の直接的な接触を妨げてしまう[37]。このように、我々が作製した新規子宮内膜オルガノイドは、これまで報告されてきた子宮内膜オルガノイドが持つ欠点を克服したものであるといえる。

我々のオルガノイドは、接着培養皿上で増殖する EECs と ESCs の自発的な 3 次元自己凝集によって作製されたと考えている (図 1)。この現象は、オルガノイド培地を用いた EECs 単独培養では観察されず (付録 3)、細胞凝集における ESCs の重要な役割が示された。組織特異的な細胞と間葉系幹細胞を接着培養で共培養すると、自発的な細胞凝集が起こることが報告されている [38]。ESCs は間葉系幹細胞の特性を有することから [39]、我々のオルガノイドも同様の凝集メカニズムによって作製された可能性が高い。また、新規子宮内膜オルガノイドは EECs が外側、ESCs が内側という細胞特異的な空間的局在を示した。in vivo では、EECs が外側に、ESCs が内側に存在していることが一般的である。よって、我々の培養方法は、細胞本来の局在に基づいた組織構築を促進したと考えている。この細胞特異的な配置はオルガノイド培養の特徴であり、自己組織化と呼ばれている [40]。注目すべきことに、オルガノイド培養培地の代わりに従来の培養培地 (DMEM に 10% FBS 添加) を用いて細胞を培養した場合、凝集塊は観察されなかった (付録 2)。これは、自己組織化が我々のオルガノイド形成の原動力であることを裏付けている。自己組織化によって形成された細胞凝集塊は、構造的および機能的に in vivo に類似していることが報告されている [41]。したがって、in vivo で観察されるように、EECs の頂端面が ESCs から離れた面に局在するようにして apical-out polarity を形成することができたと考えられる。また、浮遊培養を行うことでオルガノイド全体を EECs が覆い、EECs を in vivo に近い円柱状上皮細胞に変化させた (図 2 B)。したがって、この浮遊培養も、より in vivo に近いオルガノイドを促進するために必須の培養であった。これらの知見を総合すると、我々の研究結果は、接着培養と浮遊培養の条件下での EECs と ESCs の自己組織化を利用したオルガノイド生成の新しいアプローチを示している。

我々の新規子宮内膜オルガノイドは、着床過程における 4 段階を再現した。胚盤胞のオ

ルガノイドへの attachment、上皮細胞の invagination は in vivo と同様に観察された[42]。その後、胚盤胞は上皮細胞を貪食し、これは以前に報告された entosis の過程に類似していた[29, 30]。胚盤胞由来栄養膜細胞が間質細胞層へ浸潤すると、侵入細胞の核は巨核化し、Proliferin 陽性の栄養膜巨細胞に分化した [43, 44]。さらに、侵入した栄養膜を取り囲む ESCs は、in vivo の状況と同様に脱落膜応答を示した[45]。着床過程において ESCs は脱落膜化という細胞分化を起こして密となり、これらは栄養膜細胞と相互作用することにより浸潤過程において重要な役割を果たす[46]。したがって、子宮内膜オルガノイドにおいて密な間質細胞層を有することは不可欠である。過去の 2 つの研究において、ECM に包埋された ESCs と EECs の両方を含む子宮内膜オルガノイドが報告されている。しかし、我々のオルガノイドとは対照的に、これらのオルガノイドは間質細胞層が非常に疎であった。これは、ECM の存在によって細胞密度が低下したためであると考えられる[11, 47]。我々のオルガノイドは ECM を使用せずに細胞の自己凝集によって形成されたため、密な細胞間接触が促進され、密な間質層が再現されたと考えられる。これにより、間質細胞層内での着床現象の再現が可能になった。

ホルモンを添加したオルガノイドは、非添加オルガノイドと比較して、有意に高い着床率を示した。これは、ホルモンの添加により FOXO1 や PR を含む受容期マーカーの発現パターンを再現できたためと考えられる。一方で、ホルモン非添加群のオルガノイドでも胚盤胞のオルガノイドへの接着（浸潤を伴わない）が高い頻度で観察されたこと（26 サンプル中 11 サンプル、42.3%、付録 10）も注目すべきである。以前の報告では、エストロゲンとプロゲステロンで処理されていないマウスの子宮でも胚盤胞の接着は起こるが、胚盤胞の間質層への浸潤にはホルモン添加が必要であることが示されている[48]。これらの知見は、今回の in vitro 着床モデルの結果と一致する。よって、我々の in vitro 着床モデル

がマウスで観察される着床現象を忠実に再現していることをさらに支持するものである。

【結語】

本研究において、我々は子宮内膜上皮細胞の頂端側がオルガノイドの外側を向き、内部に子宮内膜間質細胞を有する新規の子宮内膜オルガノイドを、細胞外マトリックスを用いない方法で作製した。特筆すべきは、本研究におけるオルガノイドの作製方法は、他のいかなる組織においてもこれまで報告されていない新規のアプローチであるという点である。このオルガノイドにより、*in vitro* におけるマウス着床過程の再現が可能となった。

今後、ヒト子宮内膜細胞から同様のオルガノイド作製することで、ヒト着床におけるメカニズムのさらなる解明や、着床不全に対する新たな治療戦略の開発につながることを期待される。

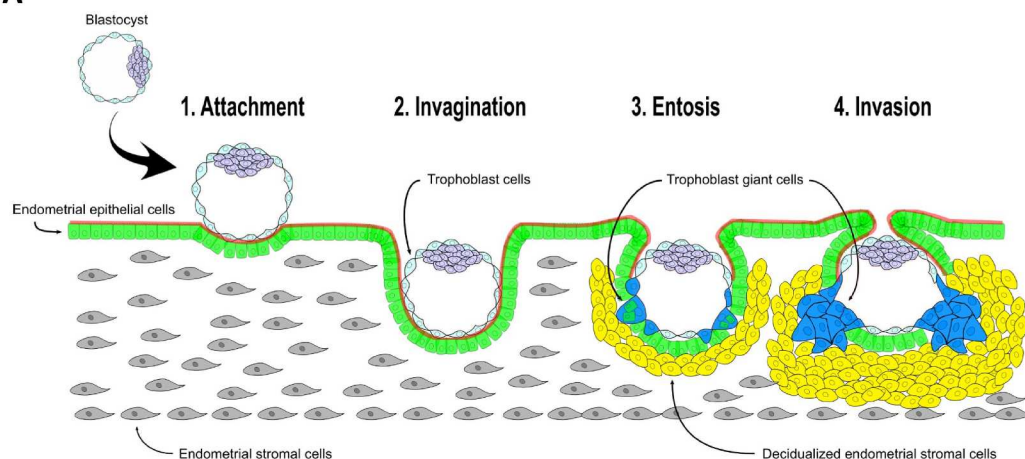
【謝辞】

本研究は、日本学術振興会科研費（課題番号: JP21K09542、JP24K12579、JP22K20741、JP23K15838、JP23H03043、20H03825）の資金提供を受けて行われた。本論文は *Development*, 2025 152:1-12 の論文の和訳であり、学位論文として用いることを許可されている。

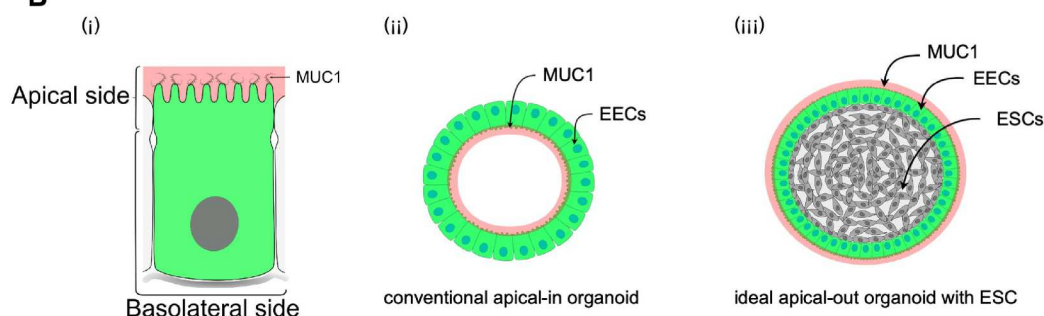
【付録】

付録 1

A



B



付録 1 着床の 4 段階と理想的なオルガノイド

(A) マウスにおける着床の 4 段階

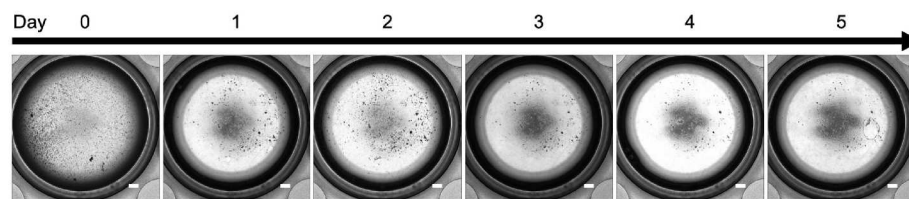
(B) 従来型オルガノイドと理想的なオルガノイドの比較 (i) Mucin-1(MUC1)は EECs の頂端側 (apical side) で発現する。(ii) 従来型オルガノイドは上皮細胞の apical-side がオルガノイドの内腔側を向いており、ESC を伴っていない。(iii) 理想的なオルガノイドは、オルガノイド外側を apical-out な EECs が覆っており、内側は ESCs で充満している。

付録 2

Target	Host	Dilution	Supplier (Catalog.#)
Primary Antibodies			
E-Cadherin	Rabbit	1:200	Cell Signaling Technology (3195)
E-Cadherin	Mouse	1:50	Cell Signaling Technology (14472)
Vimentin	Rabbit	1:500	ABCAM (ab92547)
PR(Progesterone receptor)	Rabbit	1:100	ABCAM (ab101688)
MUC1	Rabbit	1:250	ABCAM (ab109185)
Proliferin	Mouse	1:200	SANTA CRUZ (sc-271891)
Cox2	Goat	1:50	SANTA CRUZ (sc-376861)
EpCAM	Rabbit	1:100	ABCAM (ab221552)
CK8	Mouse	1:50	SANTA CRUZ (sc-8020)
PDGFRα	Rabbit	1:1000	Cell Signaling Technology (3164)
FOXA2	Rabbit	1:300	ABCAM (ab108422)
FOXO1	Rabbit	1:500	SANTA CRUZ (sc-11350)
Secondary Antibodies			
Anti-Mouse, Alexa Fluor 488-conjugated	Goat	1:1000	ABCAM (ab150113)
Anti-Rabbit, Alexa Fluor 594-conjugated	Goat	1:1000	ABCAM (ab150084)
Anti-Goat, Alexa Fluor 647-conjugated	Donkey	1:1000	ABCAM (ab150131)
Anti-Mouse, Alexa Fluor 647-conjugated	Goat	1:1000	ABCAM (ab150115)

付録 2 使用した一次抗体と二次抗体

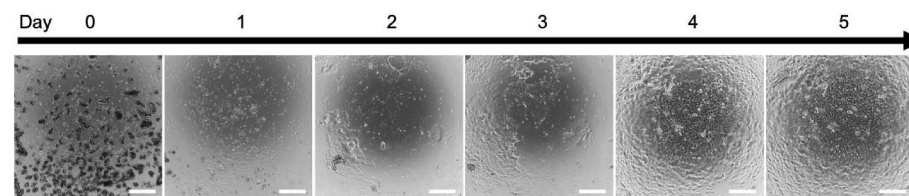
付録 3



付録 3 一般的な細胞培養培地を用いた EECs と ESCs の接着培養における明視野像

EECs と ESCs の自然凝集は観察されなかった。スケールバー：1000 μm 。

付録 4

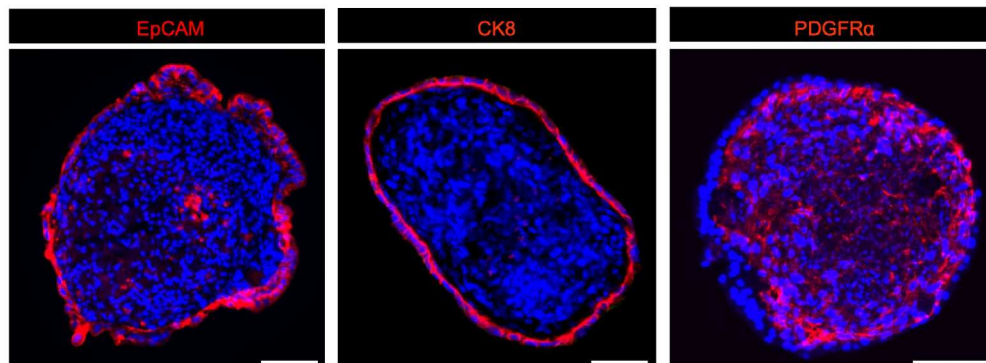


付録 4 ESCs を含まない EECs 単独での接着培養における明視野像

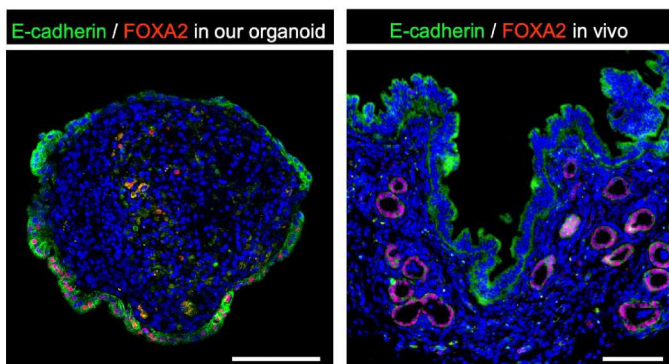
EECs の自然凝集は観察されなかった。スケールバー：1000 μm 。

付録 5

A



B



付録5 ESCs および ESCs における細胞特異的な免疫染色

- A. EECs は上皮細胞のマーカーである EpCAM と CK8 で染色した。ESCs は間質細胞のマーカーである PDGFR α で染色した。それぞれ核は DAPI で染色した。スケールバー：100 μ m。
- B. 新規子宮内膜オルガノイドを腺管上皮細胞のマーカーである FOXA2 で染色した(左)。vivo におけるマウス子宮内膜組織の染色像を陽性対照像として用いた (右)。EECs は E-cadherin、核は DAPI で染色した。スケールバー：100 μ m。単一スライス上の EECs における FOXA2 陽性細胞数をカウントし、EECs 中の FOXA2 陽性細胞の割合を検証した。新規子宮内膜オルガノイドにおける上皮細胞の $48.6 \pm 5.6\%$ (5つのオルガノイドの平均 $\pm$ 標準偏差) が FOXA2 陽性であった。これはおよそ半数の FOXA2 陰性細胞が管腔上皮細胞で構成されていることを示している。

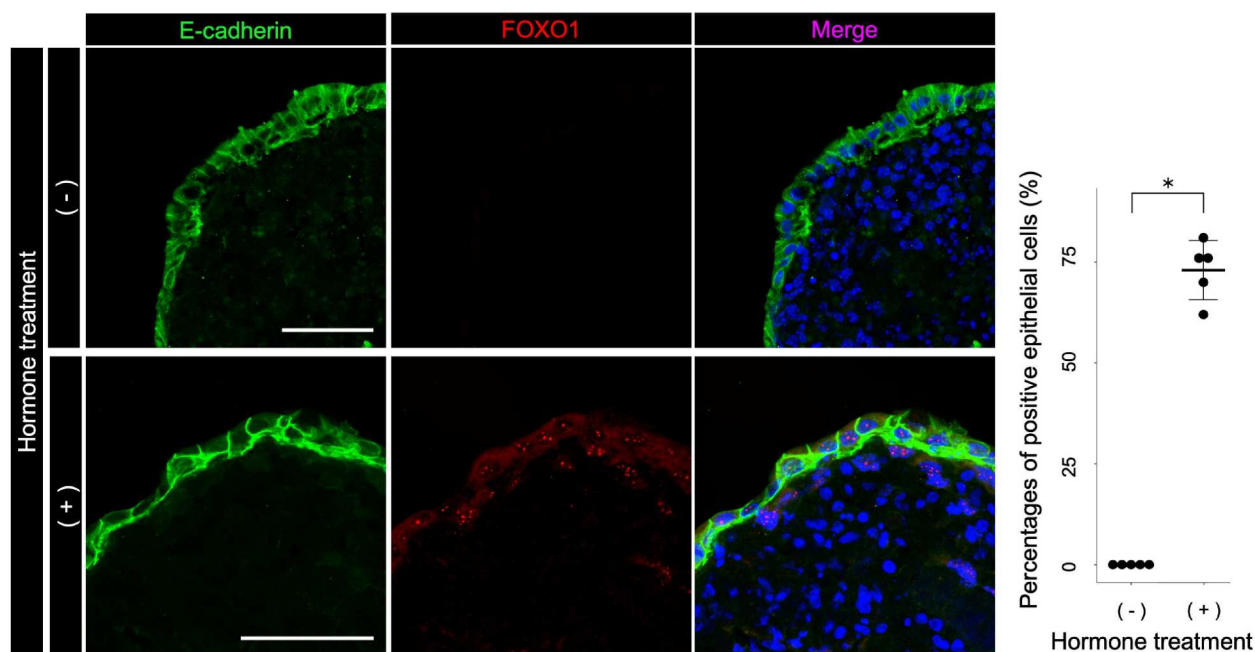
付録6



付録6 新規子宮内膜オルガノイドにおける picosirius red staining

ピンク色に染色されたコラーゲン繊維を内部に認める。スケールバー：1000 μ m。

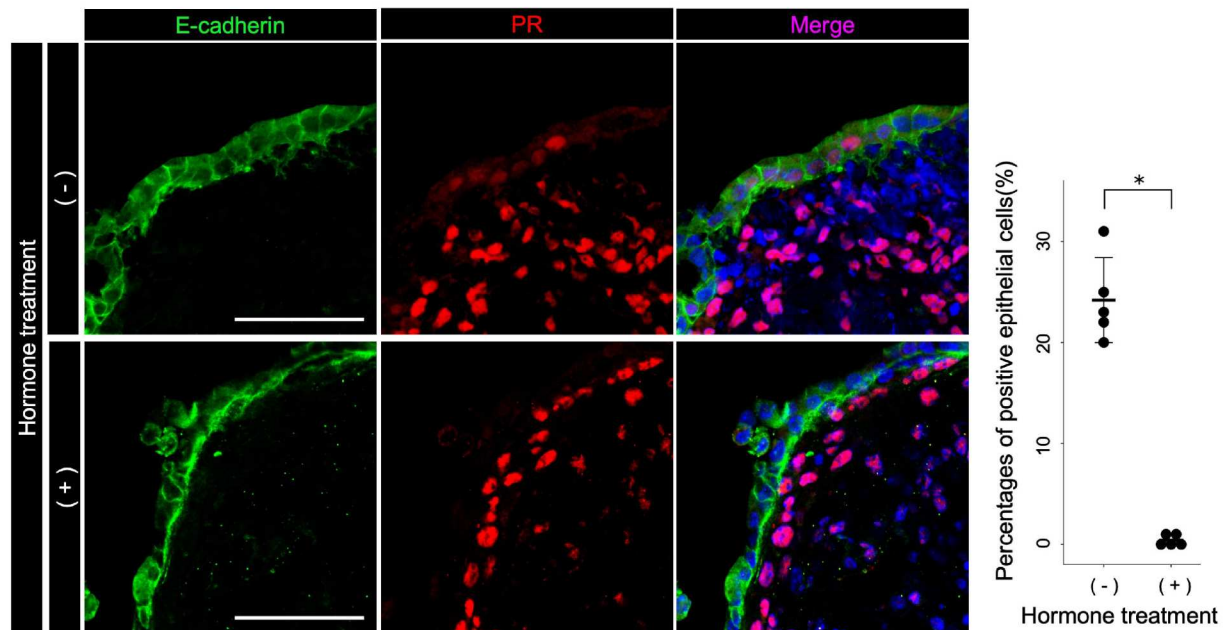
付録7



付録7 着床期子宮内膜のマーカーである FOXO1 の免疫染色

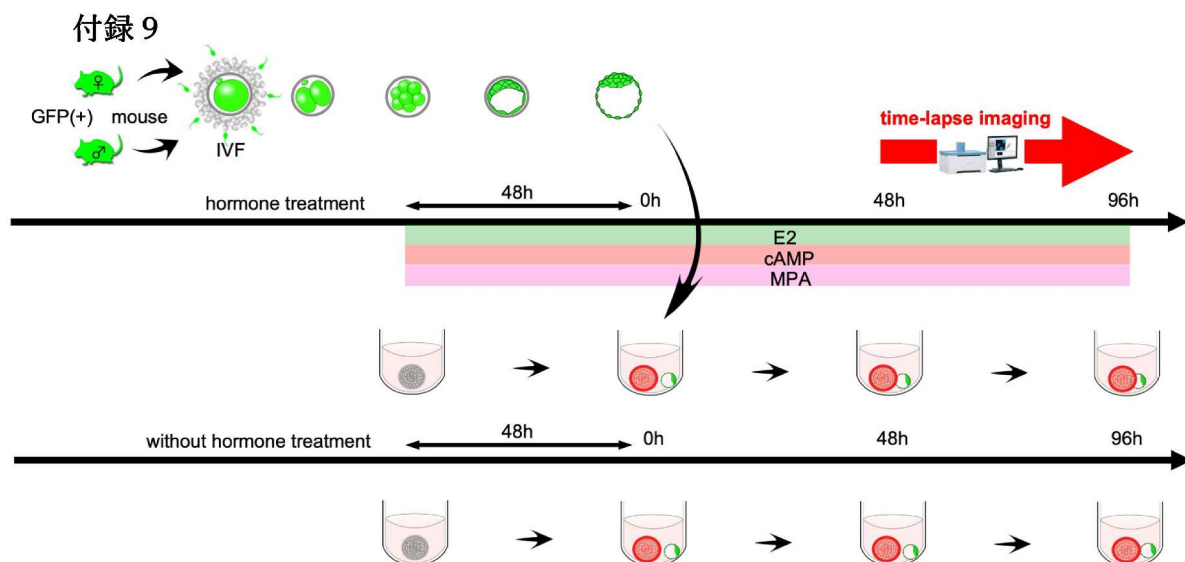
新規子宮内膜オルガノイドにおける FOXO1 の免疫染色像。EECs は E-cadherin、核は DAPI で染色した。スケールバー：50 μm 。単一スライス上の EECs における FOXO1 陽性細胞数をカウントし、EECs 中の FOXO1 陽性細胞の割合を検証した。データは5つのオルガノイドの平均値 $\pm$ 標準偏差として示され、各データはドットで表されている。*, $P < 0.01$ (t-検定)。ホルモン添加群において EECs における FOXO1 の発現上昇を認める。

付録8



付録8 新規子宮内膜オルガノイドにおける PR の免疫染色

新規子宮内膜オルガノイドにおける PR の免疫染色像。EECs は E-cadherin、核は DAPI で染色した。スケールバー：50 μm 。単一スライス上の EECs における PR 陽性細胞数をカウントし、EECs 中の PR 陽性細胞の割合を検証した。データは5つのオルガノイドの平均値 $\pm$ 標準偏差として示され、各データはドットで表されている。*, $P < 0.01$ (t-検定)。ホルモン非添加群では、EECs のにおいて PR の発現を認めたが、ホルモン添加群においては EECs における PR の発現が消失していた。



付録 9 新規子宮内膜オルガノイドを用いた in vitro 着床モデルの模式図

新規子宮内膜オルガノイドはホルモンを添加され 48 時間培養されたホルモン添加群と添加されずに 48 時間培養されたホルモン非添加群に分けられた。胚盤胞との共培養直前にオルガノイドは赤色蛍光色素で標識された。GFP トランスジェニックマウスから採取された GFP 陽性の胚盤胞は、細胞邸接着性 U 字培養皿上で新規子宮内膜オルガノイドと共培養された。in vitro 着床の過程は、共培養開始 48 時間後から 96 時間後まで、共焦点顕微鏡を用いたタイムラプスイメージングによって観察された。

付録 1 0

A

with hormone treatment							
No	fluorescence microscopy	confocal microscopy	assessment	No	fluorescence microscopy	confocal microscopy	assessment
1			invasion	14			invasion
2			attachment	15			(-)
3			invasion	16			(-)
4			invasion	17			invasion
5			invasion	18			invasion
6			invasion	19			invasion
7			invasion	20			(-)
8			invasion	21			invasion
9			invasion	22			invasion
10			invasion	23			(-)
11			invasion	24			invasion
12			(-)	25			invasion
13			invasion	26			entosis

without hormone treatment							
No	fluorescence microscopy	confocal microscopy	assessment	No	fluorescence microscopy	confocal microscopy	assessment
1			attachment	14			(-)
2			(-)	15			invasion
3			attachment	16			(-)
4			invasion	17			(-)
5			(-)	18			attachment
6			attachment	19			invasion
7			(-)	20			attachment
8			attachment	21			(-)
9			(-)	22			(-)
10			attachment	23			(-)
11			attachment	24			invasion
12			attachment	25			attachment
13			attachment	26			(-)

B

	Hormone treatment		p-value
	(+)	(-)	
Implantation rate	73.1% (19/26)	15.3% (4/26)	0.000059

付録 1 0 ホルモン添加の有無により in vitro 着床率は変化する

A. ホルモン添加群、非添加群それぞれ 26 サンプルにおいて、着床の有無を評価した。オルガノイドと胚盤胞の共培養終了後に明視野像、免疫染色像（EECs は E-cadherin で染色し赤色、胚盤胞由来細胞は GFP 陽性のため緑色）で評価した。EECs の下層にある ESCs 層内へ GFP 陽性胚盤胞由来細胞が浸潤したものを着床ありと定義した（赤色太字）。また、評価時の着床過程の進行度を右列に示す。

B. ホルモン添加群の着床率は 73.1% (19/26) であり、非添加群の 15.3% (4/26) と比較して有意に高かった ($p < 0.01$ 、Fisher の正確検定)。

【参考文献】

1. Cha, J., X. Sun, and S.K. Dey, *Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy*. Nat Med, 2012. **18**(12): p. 1754-67.
2. Bashiri, A., K.I. Halper, and R. Orvieto, *Recurrent Implantation Failure-update overview on etiology, diagnosis, treatment and future directions*. Reprod Biol Endocrinol, 2018. **16**(1): p. 121.
3. Lindenberg, S., M.H. Nielsen, and S. Lenz, *In vitro studies of human blastocyst implantation*. Ann N Y Acad Sci, 1985. **442**: p. 368-74.
4. Tan, Y., et al., *A model for implantation: Coculture of blastocysts and uterine endometrium in mice*. Biology of Reproduction, 2005. **72**(3): p. 556-561.
5. Evans, J., et al., *A novel "embryo-endometrial" adhesion model can potentially predict "receptive" or "non-receptive" endometrium*. J Assist Reprod Genet, 2020. **37**(1): p. 5-16.
6. Bentin-Ley, U., et al., *Ultrastructure of human blastocyst-endometrial interactions in vitro*. J Reprod Fertil, 2000. **120**(2): p. 337-50.

7. Li, X., et al., *Three-dimensional culture models of human endometrium for studying trophoblast-endometrium interaction during implantation*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2022. **20**(1): p. 120.
8. Boretto, M., et al., *Development of organoids from mouse and human endometrium showing endometrial epithelium physiology and long-term expandability*. *Development (Cambridge)*, 2017. **144**(10): p. 1775-1786.
9. Turco, M.Y., et al., *Long-term, hormone-responsive organoid cultures of human endometrium in a chemically defined medium*. *Nature Cell Biology*, 2017. **19**(5): p. 568-577.
10. Haider, S. and A.G. Beristain, *Human organoid systems in modeling reproductive tissue development, function, and disease*. *Hum Reprod*, 2023.
11. Rawlings, T.M., et al., *Modelling the impact of decidual senescence on embryo implantation in human endometrial assembloids*. *eLife*, 2021. **10**: p. 1-24.
12. Gellersen, B. and J. Brosens, *Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: a decidualizing affair*. *J Endocrinol*, 2003. **178**(3): p. 357-72.
13. Tamura, I., et al., *Glucose and lipid metabolisms in human endometrial stromal cells during decidualization*. *Endocr J*, 2023. **70**(5): p. 465-472.
14. Wang, G., et al., *Nonobese diabetic/severe combined immunodeficient murine xenograft model for human uterine leiomyoma*. *Fertil Steril*, 2014. **101**(5): p. 1485-92.
15. Sato, T., et al., *Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium*. *Gastroenterology*, 2011.

- 141(5): p. 1762-72.
16. Susaki, E.A., et al., *Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis*. Cell, 2014. **157**(3): p. 726-39.
 17. Tainaka, K., et al., *Chemical Landscape for Tissue Clearing Based on Hydrophilic Reagents*. Cell Rep, 2018. **24**(8): p. 2196-2210 e9.
 18. Sakai, T., et al., *Establishment of a 3D spheroid culture system to evaluate the responsiveness of uterine leiomyoma cells to female hormones*. Reprod Med Biol, 2025. **24**(1): p. e12627.
 19. Umehara, T., et al., *Cutting the ovarian surface improves the responsiveness to exogenous hormonal treatment in aged mice*. Reprod Med Biol, 2020. **19**(4): p. 415-424.
 20. Takagi, H., et al., *Transcriptional coactivator PGC-1 α contributes to decidualization by forming a histone-modifying complex with C/EBP β and p300*. Journal of Biological Chemistry, 2022. **298**(5): p. 101874-101874.
 21. Tomikawa, J., et al., *Nuclear transfer system for the direct induction of embryonic transcripts from intra- and cross-species nuclei using mouse 4-cell embryos*. STAR Protoc, 2022. **3**(2): p. 101284.
 22. Fan, W., et al., *Zona pellucida removal by acid Tyrode's solution affects pre- and post-implantation development and gene expression in mouse embryos*. Biol Reprod, 2022. **107**(5): p. 1228-1241.
 23. Kelleher, A.M., et al., *Forkhead box a2 (FOXA2) is essential for uterine function and fertility*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of

- America, 2017. **114**(6): p. E1018-E1026.
24. Gnecco, J.S., et al., *Organoid co-culture model of the human endometrium in a fully synthetic extracellular matrix enables the study of epithelial-stromal crosstalk*. *Med*, 2023. **4**(8): p. 554-579 e9.
 25. Brayman, M., A. Thathiah, and D.D. Carson, *MUC1: a multifunctional cell surface component of reproductive tissue epithelia*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2004. **2**: p. 4.
 26. Whitby, S., W. Zhou, and E. Dimitriadis, *Alterations in Epithelial Cell Polarity During Endometrial Receptivity: A Systematic Review*. *Frontiers in Endocrinology*, 2020. **11**(October): p. 1-14.
 27. Quinn, K.E., et al., *Pinopodes: Recent advancements, current perspectives, and future directions*. *Mol Cell Endocrinol*, 2020. **501**: p. 110644.
 28. Vasquez, Y.M., et al., *FOXO1 regulates uterine epithelial integrity and progesterone receptor expression critical for embryo implantation*. *PLoS Genetics*, 2018. **14**(11): p. 1-27.
 29. White, E., *Entosis: it's a cell-eat-cell world*. *Cell*, 2007. **131**(5): p. 840-2.
 30. Li, Y., X. Sun, and S.K. Dey, *Entosis allows timely elimination of the luminal epithelial barrier for embryo implantation*. *Cell Rep*, 2015. **11**(3): p. 358-65.
 31. Vento-Tormo, R., et al., *Single-cell reconstruction of the early maternal-fetal interface in humans*. *Nature*, 2018. **563**(7731): p. 347-353.
 32. Gellersen, B. and J.J. Brosens, *Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure*. *Endocr Rev*, 2014. **35**(6): p. 851-905.
 33. Tamura, I., et al., *The essential glucose transporter GLUT1 is epigenetically*

- upregulated by C/EBPbeta and WT1 during decidualization of the endometrium.* J Biol Chem, 2021. **297**(4): p. 101150.
34. Tamura, I., et al., *Transcription factor C/EBPbeta induces genome-wide H3K27ac and upregulates gene expression during decidualization of human endometrial stromal cells.* Mol Cell Endocrinol, 2021. **520**: p. 111085.
 35. Tamura, I., et al., *Genome-wide analysis of histone modifications that underlie the dynamic changes in gene expression during decidualization in human endometrial stromal cells.* Mol Hum Reprod, 2023. **29**(7).
 36. Matsumoto, L., et al., *HIF2alpha in the uterine stroma permits embryo invasion and luminal epithelium detachment.* J Clin Invest, 2018. **128**(7): p. 3186-3197.
 37. O'Connor, B.B., et al., *The role of extracellular matrix in normal and pathological pregnancy: Future applications of microphysiological systems in reproductive medicine.* Exp Biol Med (Maywood), 2020. **245**(13): p. 1163-1174.
 38. Takebe, T., et al., *Massive and Reproducible Production of Liver Buds Entirely from Human Pluripotent Stem Cells.* Cell Reports, 2017. **21**(10): p. 2661-2670.
 39. Gargett, C.E., et al., *Isolation and culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human endometrium.* Biol Reprod, 2009. **80**(6): p. 1136-45.
 40. Hofer, M. and M.P. Lutolf, *Engineering organoids.* Nat Rev Mater, 2021. **6**(5): p. 402-420.
 41. Brassard, J.A. and M.P. Lutolf, *Engineering Stem Cell Self-organization to Build Better Organoids.* Cell Stem Cell, 2019. **24**(6): p. 860-876.
 42. Yuan, J., et al., *Tridimensional visualization reveals direct communication between*

- the embryo and glands critical for implantation*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 603.
43. Yamaguchi, M., et al., *Co-localization of placental lactogen-I, placental lactogen-II, and proliferin in the mouse placenta at midpregnancy*. Biol Reprod, 1994. **51**(6): p. 1188-92.
 44. Yang, Y., et al., *Derivation of Pluripotent Stem Cells with In Vivo Embryonic and Extraembryonic Potency*. Cell, 2017. **169**(2): p. 243-257.e25.
 45. Aikawa, S., et al., *A gene network of uterine luminal epithelium organizes mouse blastocyst implantation*. Reproductive Medicine and Biology, 2022. **21**(1): p. 1-181.
 46. Gellersen, B., I.A. Brosens, and J.J. Brosens, *Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions, and clinical perspectives*. Semin Reprod Med, 2007. **25**(6): p. 445-53.
 47. Shibata, S., et al., *Modeling embryo-endometrial interface recapitulating human embryo implantation*. Sci Adv, 2024. **10**(8): p. eadi4819.
 48. Grant, P.S., I. Ljungkvist, and O. Nilsson, *The hormonal control and morphology of blastocyst invasion in the mouse uterus*. J Embryol Exp Morphol, 1975. **34**(2): p. 299-310.